

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

*Жильцов И.В., Веремей И.С., Семенов В.М., Генералов И.И.,
Дмитраченко Т.И., Василенко Н.В., Акулич Н.Ф., Лавринович Д.Н.,
Ляховская Н.В., Зенькова С.К., Стахович И.И., Васильева М.А.,
Семенов С.В., Первалов О.Я., Говорушкина Н.К.
МО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Введение. Продукция бета-лактамаз у многих видов микроорганизмов может быть выявлена с помощью чувствительных хромогенных тестов, основанных на использовании специальных субстратов, изменяющих окраску в результате расщепления, или на анализе реакции, вызванной процессом гидролиза бета-лактамов [1, 2]. Наиболее широко используемым хромогенным субстратом является нитроцефин – цефалоспорин, расщепляемый большинством бета-лактамаз с образованием продукта, окрашенного в интенсивно-красный цвет [3].

Наряду с нитроцефиновым методом, существует также неокупроиновый метод определения бета-лактамазной активности, основанный на реакции комплексообразования ионов меди, неокупроина и гидролизованной бета-лактамной связи различных производных 6-аминопенициллановой кислоты, в результате которой образуется комплексное соединение желтого цвета [2]. Альтернативные методы детектирования бета-лактамазной активности включают йодометрические и алидометрические тесты.

Цель. Целью работы научного коллектива являлся выбор наиболее чувствительного, специфичного и воспроизводимого метода оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов с намерением дальнейшей его адаптации для выполнения в микроварианте с использованием планшетного ридера.

Низкая стоимость реагентов и расходных материалов приветствовалась, но первоостепенной целью не являлась. Конечной целью исследования было создание простой в использовании, но надежной и чувствительной тест-системы для выявления и количественной оценки бета-лактамазной активности в биологических субстратах (крови, слюне, мокроте, спинномозговой жидкости).

Материалы и методы. Нами была проведена сравнительная оценка неокупроиновой и нитроцефиновой методик для определения бета-лактамазной активности биологических субстратов. Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а.

Измерение оптических плотностей проводили при помощи планшетного

ридера производства ОАО «Витязь» Определялась бета-лактамазная активность сыворотки крови 382 больных рожей, пневмонией, серозными и гнойными менингитами, острым гнойным тонзиллитом, аденовирусной инфекцией, лиц с травматологической патологией, а также практически здоровых военнослужащих.

Сыворотка крови больных была получена центрифугированием крови, выдержанной в холодильной камере при 4°C в течение 4-6 часов для образования фибринового сгустка.

Полученная сыворотка крови сохранялась до момента эксперимента в морозильной камере при -20°C.

В качестве субстрата для определения каталитической активности сыворотки крови неокупроиновым методом использовали бензилпенициллина натриевую соль (химически чистая субстанция производства Sigma). В качестве субстрата для определения бета-лактамазной активности сыворотки крови нитроцефиновым методом использовали химически чистый нитроцефин производства Merck.

В процессе сравнения обоих методик определяли оптимальные температуру и продолжительность инкубации тест-объектов с субстратами, оптимальные концентрации субстратов и тест-объектов, минимальный уровень бета-лактамазной активности, регистрируемый каждой из методик, а также сравнительную стоимость реагентов и расходных материалов, необходимых для выполнения обоих методов.

Результаты и обсуждение. С одной стороны, неокупроиновый метод имеет очень существенное преимущество по сравнению с нитроцефиновым - он позволяет вводить в аналитическую систему бета-лактамы антибиотиков различных групп.

Соответственно, неокупроиновый метод позволяет документировать распад различных антибиотиков бета-лактаманного ряда, непосредственно интересующих исследователя либо клинициста. В случае же нитроцефиновой методики и субстратом реакции, и хромогеном является сам нитроцефин, который регистрирует некую «интегральную» бета-лактамазную активность объекта, весьма условно соотносимую с распадом антибиотиков, реально используемых в клинической практике.

Кроме того, неокупроин существенно (\approx в 1400 раз на единицу веса) дешевле и доступнее нитроцефина.

С другой стороны, в процессе практической апробации неокупроинового метода выявился его существенный недостаток - недостаточно высокая чувствительность, компенсировать которую оказалось возможным только за счет существенного снижения разрешающей способности методики.

В частности, было установлено, что метод надежно регистрирует бета-лактамазную активность, приблизительно эквивалентную действию 10 ЕД бактериальной пенициллиназы (из *Bacillus cereus*) в 1 мл биологического образца, причем самораспад антибиотика-субстрата (химически чистой субстанции бензилпенициллина) в реакционной смеси за время инкубации (30 минут) составляет 22-23% и быстро нарастает с течением времени. Оказалось также, что бета-лактамазная активность крови не менее чем у 274 больных из 382 изученных (т.е. у 71,7%) лежит ниже предела чувствительности метода, что привело к получению результатов клинической апробации методики, не поддающихся трактовке.

Указанных недостатков оказался лишен нитроцефиновый метод, который надежно регистрировал бета-лактамазную активность сыворотки крови, соответствующую 0,5 ЕД бактериальной пенициллиназы из *Bacillus cereus* на 1 мл биологического образца, при этом уровень самораспада нитроцефина за время инкубации (30 минут при 37°C) оказался пренебрежимо малым (0,99% от исходной концентрации за 1 час инкубации при 37°C).

Более того, воспроизводимость результатов неокупроинового метода оказалась существенно ниже, чем нитроцефиновой. Так, коэффициент вариации (variation coefficient) неокупроинового метода составлял в лучшем случае 13,14%, в то время как аналогичный показатель нитроцефинового метода - 3,58% (максимальный коэффициент вариации, допустимый для диагностической методики - 10%).

При этом оказалось, что на одно определение расходуется крайне малое количество нитроцефина - порядка 0,5 мкг, и, соответственно, одной его упаковки (5 мг) в идеальном случае достаточно для 1000 определений. Ввиду этого, несмотря на значительную стоимость нитроцефина (до 112 € за упаковку), стоимость одного исследования невелика (около 0,1 €) и сравнима со стоимостью одного исследования с применением неокупроинового метода (0,107 €).

Выводы Нитроцефиновая методика в 50 раз чувствительнее неокупроинового, ее воспроизводимость в 3,7 раза выше, а стоимость одного определения у обеих методик практически одинакова.

Единственный недостаток нитроцефинового метода - невозможность использования произвольных бета-лактамных антибиотиков в качестве субстратов

Литература:

1. Livernore, D.M. b-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance / D.M. Livernore, J.D. Williams // In: Lorian V., editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991; 503-578.
2. Menashi, A.C. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity / A.C. Menashi, J. Abraham, A.M. Menashi // *Analytical Biochemistry* - 1988. - Vol. 168 - P. 252-258.
3. Payne, D.J. Biochemical and enzyme kinetic Applications for the Characterization of b-lactamases / D.J. Payne, T.H. Farmer // In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press - 1998. - P. 513-535.